

美国 BioXL 黄曲霉素 M₁ 一步法 ELISA 试剂盒说明书

1 概述

黄曲霉素是霉菌的产物，高毒性并致癌。黄曲霉素 M₁ 不是微生物而是在动物体中由黄曲霉素 B₁ 转化形成的。当奶牛食用有黄曲霉素 B₁ 污染的饲料后，通过消化和分泌，黄曲霉素就会转化为羟基化的黄曲霉素 M₁，绝大部分分泌到乳汁中。因此，黄曲霉素 M₁ 浓度反映了饲料中黄曲霉素 B₁ 的含量。欧盟对奶中的黄曲霉素 M₁ 限量是 0.05ppb (50ppt)。

用竞争酶联免疫分析法检测生物样本中的黄曲霉素 M₁。所有酶联免疫分析的试剂包括标准品都由试剂盒提供。

检测数量：96 孔（含标准品孔）

检测时间：20 分钟

2 使用领域

黄曲霉素 M₁ELISA 试剂盒用于定量检测牛奶和奶酪中的黄曲霉素 M₁。

3 检测原理

分析在包被有黄曲霉素 M₁ 抗体的聚苯乙烯微孔中进行。黄曲霉素 M₁ 标准溶液和样品加入微孔，在温浴过程中，游离的黄曲霉素 M₁ 分子与抗体结合，没有结合的物质在清洗步骤中被清洗，第二次温浴时已经加入 HRP-黄曲霉素 M₁ 酶标物，它将没有结合的抗体位点全部覆盖。通过加入基底物质可以确定酶活性，第三次温浴时酶将无色的显色剂转变成一种蓝色，加入终止液使蓝色变成黄色，用酶标仪在 450nm 测定吸光度，通过颜色深浅不同换算成黄曲霉素 M₁ 的浓度值。

4 提供的试剂

- 4.1 酶标板：1 块（12 条×8 孔，可拆分）
- 4.2 酶标物溶液：1 瓶（13mL）
- 4.3 样品稀释液：1 瓶（使用时加入 40mL 双蒸水充分溶解后使用）
- 4.4 清洗液 10×：1 瓶（50mL）
- 4.5 显色剂：1 瓶（13mL）
- 4.6 终止液：1 瓶（13mL）
- 4.7 黄曲霉素 M₁ 标准品：6×1mL/管（0ng/mL，0.005 ng/mL，0.03 ng/mL，0.15 ng/mL，0.5 ng/mL，2 ng/mL）

5 需要而未提供的材料

- 5.1 10~1000μL 不同规格的微量移液器
- 5.2 50~300μL 多通道微量移液器
- 5.3 酶标仪（有 450nm 滤光片）
- 5.4 离心机（如果离心速度低最好使用低温离心机）
- 5.5 带盖试管
- 5.6 涡旋振荡器
- 5.7 正己烷
- 5.8 二氯甲烷
- 5.9 离心管

6 贮存

- 6.1 试剂盒贮存于 2~8℃，切勿冷冻
- 6.2 未用完的微孔板及试剂应密封干燥 2~8℃ 保存

7 注意事项

- 7.1 终止液具有刺激性，显色剂具有毒性，切勿接触皮肤
- 7.2 不要在有效期过后使用试剂
- 7.3 不同批号的试剂盒中的试剂不得混用
- 7.4 样品及标准品所用吸头不得混用，否则会影响试验结果
- 7.5 使用试剂盒前请仔细阅读说明书

8 工作液准备

- 8.1 酶标物溶液：使用前恢复至室温，并且摇匀使用
- 8.2 样品稀释工作液：使用时加入 40mL 双蒸水充分溶解后使用
- 8.3 清洗液：用蒸馏水按 1：10（1+9）稀释
- 8.4 显色剂：已备用，避免光线直照
- 8.5 终止液：已备用
- 8.6 黄曲霉素 M₁ 标准品：已备用

9 样品预处理

- 9.1 牛奶
 - 9.1.1 样品冷藏，2~8℃ 下 3000g 离心 10min
 - 9.1.2 分离奶脂和奶清
 - 9.1.3 奶清取 50μL 直接检测

稀释倍数：1
- 9.2 奶粉
 - 9.2.1 称取奶粉 1g 加 10mL 蒸馏水
 - 9.2.2 振荡使奶粉彻底溶化后取 50μL 用于检测

稀释倍数：10

9.3 奶酪

- 9.3.1 不要另加液体捣碎样本
- 9.3.2 称取 2g 碎奶酪放入带盖试管
- 9.3.3 加入 15mL 二氯甲烷振摇抽提 30min
- 9.3.4 过滤上清液
- 9.3.5 转移 3.75mL 抽提液到另一试管，60℃ 下氮气吹干
- 9.3.6 用 750μL 样品稀释液重新溶解并涡旋混匀 1min
- 9.3.7 加入 750μL 正己烷，涡旋抽提 1min
- 9.3.8 2000g 离心 15min
- 9.3.9 移去上层正己烷
- 9.3.10 取 50μL 甲醇/ aqueous 相，用 200μL 样品稀释液在小离心管中稀释后混匀取 50μL 用于检测

稀释倍数：2

注意：本说明书提供的样品前处理方法仅作参考，实验人员可以根据自己的经验作改善以提高检测准确度。

10 酶免分析步骤

10.1 实验须知

- 10.1.1 实验开始前请将所有试剂于盒外充分恢复至室温（20~25℃），时间约 1~2 小时或更长，保证回温充分。多余的微孔重新密封后立即于 2~8℃ 干燥保存

注：一定保证回温充分，否则影响检测的精确度和准确度

- 10.1.2 使用后请立即将试剂放回 2~8℃ 保存
- 10.1.3 请不要改变分析步骤
- 10.1.4 请使用精确的微量移液器
- 10.1.5 操作一旦开始，请不要中断任何程序
- 10.1.6 ELISA 结果的可重复性极大程度的取决于操作程序，请严格按照要求操作
- 10.1.7 为避免交叉污染，每个标准品和样品均应使用不同的吸头加样
- 10.1.8 加样时请勿让吸头接触微孔中的溶液或内表面

10.2 分析步骤

- 10.2.1 预先进行编号，标记 B₀、标准品和样品的位置，推荐进行双孔检测
- 10.2.2 从板上取下所需数量的微孔（微孔可分离），将多余的重新密封并放回 2~8℃ 保存
- 10.2.3 将样品稀释液、清洗液（10×）配制成工作液
- 10.2.4 在 B₀ 孔中加入 50μL 0.0ng/mL 标准品溶液
- 10.2.5 在各标准孔中加入 50μL 的标准品溶液

- 10.2.6 在各样品孔中加入 50μL 样品溶液
- 10.2.7 立即在所有孔中加入 100μL 的酶标物（强烈推荐使用多通道移液器）
- 10.2.8 轻轻晃动反应板几秒钟
- 10.2.9 室温下（22~24℃）温浴 10min（温浴过程中不时轻拍振荡反应板或在平面上做圆周运动，可以减少双孔误差）

10.3 清洗步骤（3~4 次）

- 10.3.1 倒掉微孔中的液体
- 10.3.2 在所有微孔中加满清洗液（250~300μL）
- 10.3.3 重复上述两步骤 3 遍以上
- 10.3.4 在吸水纸上拍打，彻底清除微孔中的残留液和气泡（**拍打后未被清除的气泡可用洗耳球吹破**）

拍干后立即进行下一步骤，切勿让微孔干燥

10.4 反应步骤

- 10.4.1 清洗程序完成后，立即用微量移液器在每个微孔中加入 100μL 显色剂（强烈推荐使用多通道移液器）；晃动反应板使之彻底混匀
- 10.4.2 室温下（22~24℃）温浴 10min
- 10.4.3 每孔中加入 100μL 终止液（强烈推荐使用多通道加样器），混匀
- 10.4.4 在 450nm 下检测吸光度，结果在 10min 内读取最佳，30min 内有效

11 结果计算

- 11.1 计算每个标准品和样品的平均吸光度
- 11.2 所有标准品和样品的平均吸光度除以零标准的平均吸光度，再乘以 100，即得以%表示的结合率：

$$\frac{\text{标准（或样品）的吸光度}}{\text{零标准的吸光度}} \times 100 = \frac{B}{B_0} (\%)$$

- 11.3 将每个标准的 B/ B₀ 值输入半对数系统中，对应于各自的黄曲霉素 M₁ 标准的浓度可以获得一个标准曲线
- 11.4 用样品的 B/ B₀ 值在标准曲线中就可以找到对应的黄曲霉素 M₁ 浓度
- 11.5 在标准曲线中得到的浓度结果还要最后乘上相应的稀释倍数，获得样品稀释前实际的黄曲霉素 M₁ 含量，用 ppb（μg /kg 或 μg /L）表示

12 特异性

黄曲霉素 M₁ELISA 试剂盒的特异性是通过与相应物质进行交叉反应试验来确定的，结果如下：

物质	交叉反应 (%)
黄曲霉素 M ₁	100
黄曲霉素 M ₂	3
黄曲霉素 B ₁	2.8
黄曲霉素 B ₂	<0.1
黄曲霉素 G ₁	<0.1
黄曲霉素 G ₂	<0.1

13 试剂盒参数

13.1 本试剂盒灵敏度：0.005ng/mL

13.2 本试剂盒 IC₅₀ 值：0.03~0.06ng/mL

13.3 B₀ 吸光度最大值应大于 0.8

13.4 试剂盒吸光度板内误差小于 7%，板间误差小于 10%

13.5 不同样品最低检测限：

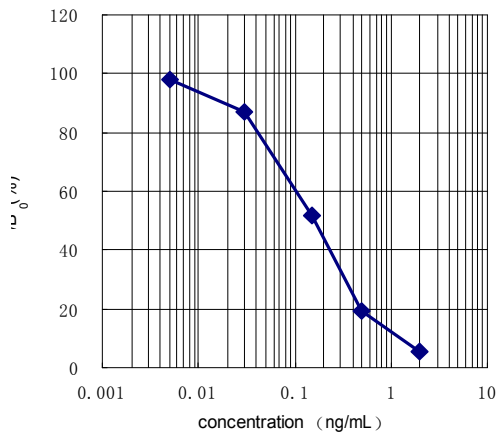
奶样：0.08μg/kg

13.6 不同样品根据说明书提供对应前处理方法的回收率：

奶样：>80%

14 标准曲线模式

试剂盒提供的标准曲线范围为 0.005~2ng/mL



15 分析限制

本试剂盒检测为阳性的样品（根据欧盟法律浓度高于 50ppt）应该用另一种方法如 HPLC 或 GC/MS 加以确证